



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543 | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 98/47000 (43) Date de publication internationale: 22 octobre 1998 (22.10.98) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00772 (22) Date de dépôt international: 16 avril 1998 (16.04.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/04923 16 avril 1997 (16.04.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ELAISSARI, Abdelhamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod, F-69007 Lyon (FR). DURACHER, David [FR/FR]; 104, rue du Valmartin, F-78860 Saint Nom la Breteche (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F-69960 Corbas (FR). MALLET, François [FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne (FR). NOVELLI-ROUSSEAU, Armelle [FR/FR]; 29, rue du Parc, F-38180 Seyssins (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR). | | (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (54) Title: METHOD FOR ISOLATING A TARGET BIOLOGICAL MATERIAL, CAPTURE PHASE, DETECTION PHASE AND REAGENT (54) Titre: PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN MATERIEL BIOLOGIQUE CIBLE, PHASE DE CAPTURE, PHASE DE DETECTION ET REACTIF (57) Abstract <p>The invention concerns a method for isolating a target biological material contained in a sample, consisting in the following steps: providing a capture phase, in microparticulate or linear form, consisting of at least a first particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and first complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a first transition metal, which is itself bound to a first biological entity capable of specifically recognising the target biological material; contacting said target biological material with at least the capture phase; and detecting the capture phase-target biological material complex, optionally with a detection phase, in microparticulate or linear form, and consisting of at least a second particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and second complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a second transition metal, which is itself bound to a second biological entity capable of specifically recognising the target biological material, and a marker.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible contenu dans un échantillon, selon lequel on dispose d'une phase de capture, sous forme microparticulaire ou linéaire, et constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des premiers groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un premier métal de transition, qui est lui-même lié à une première entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible; on met en contact ledit matériel biologique cible avec au moins la phase de capture; et on détecte le complexe phase de capture - matériel biologique cible, éventuellement avec une phase de détection, une phase de détection sous forme microparticulaire ou linéaire, et constituée par au moins un second polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un second métal de transition, qui est lui-même lié à une seconde entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible, et un marqueur.</p> | | |

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-521625
(P2001-521625A)

(43) 公表日 平成13年11月6日 (2001. 11. 6)

| | | | |
|---------------------------|------|----------------|--------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
| G 0 1 N 33/543 | | G 0 1 N 33/543 | |
| C 0 8 F 220/54 | | C 0 8 F 220/54 | |
| G 0 1 N 33/545 | | G 0 1 N 33/545 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

| | |
|---------------|-----------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平10-543572 |
| (86) (22) 出願日 | 平成10年4月16日 (1998. 4. 16) |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成11年10月13日 (1999. 10. 13) |
| (86) 国際出願番号 | P C T / F R 9 8 / 0 0 7 7 2 |
| (87) 国際公開番号 | W O 9 8 / 4 7 0 0 0 |
| (87) 国際公開日 | 平成10年10月22日 (1998. 10. 22) |
| (31) 優先権主張番号 | 9 7 / 0 4 9 2 3 |
| (32) 優先日 | 平成9年4月16日 (1997. 4. 16) |
| (33) 優先権主張国 | フランス (F R) |

| | |
|----------|---|
| (71) 出願人 | ペーイーオー メリュー フランス国 69280 マルスイー レトワ ル シュマン ドゥ ローム (番地なし) |
| (72) 発明者 | エライサリ, アブデルハミド フランス国 69007 リヨン リュ ジャ ック モノ 7 |
| (72) 発明者 | デュラシェ, ダヴィッド フランス国 78860 サン ノム ラ ブ レトウシュ リュ デュ ヴァルマルタン 104 |
| (74) 代理人 | 弁理士 志賀 正武 (外8名) |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的生物学的物質を単離するための方法、捕獲相、検出相、及び試薬

(57) 【要約】

本発明は、以下の段階より成る、サンプル中に含まれる標的生物学的物質を単離するための方法に関する：マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも第一の微粒子または線上ポリマー、及び第一の錯体化基より成る捕獲相を提供することであり、錯体化基は標的生物学的物質を特異的に認識することが可能な第一の生物学的種にそれ自体結合する第一の遷移金属に対する配位によって結合している；上記標的生物学的物質を少なくとも捕獲相と接触させること；及び任意に、微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも第二の微粒子または線上ポリマー、及び第二の錯体化基より成る検出相を使用して、捕獲相-標的生物学的物質錯体を検出することであり、錯体化基は標的生物学的物質を特異的に認識することが可能な第二の生物学的種にそれ自体結合する第二の遷移金属、及びマーカに対する配位によって結合している。

【特許請求の範囲】

1. 捕獲相を使用し、標的生物学的物質を少なくとも捕獲相と接触させ、捕獲相／標的生物学的種錯体を検出することを特徴とする、サンプル中に含まれる標的生物学的物質を単離するための方法であって、捕獲相はマイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第一の錯体化基より成り、これらの基は標的生物学的物質を特異的に認識することが可能な第一の生物学的種にそれ自体結合する第一の遷移金属に対する配位によって結合していることを特徴とする方法。

2. 捕獲相が、検出相を得るためにマーカールを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

3. マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基より成る検出相も使用し、これらの基は標的生物学的物質を特異的に認識することが可能な第二の生物学的種にそれ自体結合する第二の遷移金属、及びマーカールに対する配位によって結合していることを特徴とする請求項1記載の方法。

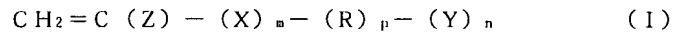
4. 第一及び／または第二のポリマーが、親水性ポリマーの群から選択されることを特徴とする請求項1または3記載の方法。

5. 第一及び／または第二のポリマーが、水、溶性モノマー、アクリルアミド、アクリルアミド誘導体、メタクリルアミドまたはメタクリルアミド誘導体、少なくとも一つの架橋剤、及び少なくとも一つの官能性モノマーの重合によって得られる官能化ポリマーであることを特徴とする請求項4記載の方法。

6. 水溶性モノマーが、N-イソプロピルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-n-イ

ソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、及びN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから選択され、第一のモノマーは好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAM）であることを特徴とする請求項5記載の方法。

7. 官能性モノマーが、以下の式(I)：



[式中、Zは、H、C1-C5アルキル基、またはベンジル、-COOHまたは
-CO-NH-CH(CH₃)₂基を表し、

Yは、-CH₂-COOH、-N(CH₂-COOH)₂、
-N(CH-COOH)(CH₂-COOH) または -(CH₂-CH₂-NH)₂、
|
(CH₂-COOH)を表し、

Xは、-NH(CH₂-CH₂-)、-N(CH₂-CH₂-)₂、-N(CH₂-C
OOH)(CH₂-CH₂-)、またはCH(COOH)-を表し、

Rは、任意にOまたはNのような少なくとも一つのヘテロ原子が間に入つた直
鎖状炭化水素ベース鎖を表し、

mおよびpはそれぞれ、互いに独立な0または1に等しい整数であり、そして
nは、1から3の間の範囲の整数である]

に相当することを特徴とする請求項5記載の方法。

8. 官能性モノマーが、任意に窒素を含有するカルボン酸誘導体、イタコン酸、
アクリル酸誘導体、及びメタクリル酸誘導体から選択されることを特徴とする請
求項7記載の方法。

9. 捕獲相及び／または検出相がマイクロ微粒子形態で存在し、平均粒径が5 μ
m以下であることを特徴とする請求項1ないし8のいずれか一項記載の方法。

10. 捕獲相が平坦なまたは微粒子支持体も含むことを特徴とする請求項1記載
の方法。

11. 支持体が微粒子であり、有機または無機の、親水性または疎水性のコアよ
り成ることを特徴とする請求項10記載の方法。

12. 上記コアが、ポリスチレン、シリカ及び金属酸化物を含む群から選択され
ることを特徴とする請求項11記載の方法。

13. 上記コアが磁性化合物も含むことを特徴とする請求項11または12記載

の方法。

14. 上記コアが上記第一のポリマーを使用して被覆されており、このポリマーが直鎖状であることを特徴とする請求項11ないし13のいずれか一項記載の方法。

15. 上記コアが上記ポリマーを使用して被覆されており、上記ポリマーが微粒子であることを特徴とする請求項11ないし13のいずれか一項記載の方法。

16. 第一及び／または第二のポリマーが、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)であり、錯体化基がイタコン酸または無水マレイン酸-共-メチルビニルエーテルから由来することを特徴とする請求項1または3記載の方法。

17. 第一及び／または第二の遷移金属が、亜鉛、ニッケル、銅、コバルト、鉄、マグネシウム、マンガン、鉛、パラジウム、白金及び金から選択されることを特徴とする請求項1または3記載の方法。

18. 第一の生物学的種を捕獲相と接触させること、及び／または第二の生物学的種を検出相と接触させることが、それぞれ上記第一及び第二の生物学的種の等

電点以上のpHで実施されることを特徴とする請求項1または3記載の方法。

19. 第一及び／または第二の生物学的種が、ヒスチジン及び／またはシステインに富むことを特徴とする請求項1または3記載の方法。

20. 凝集反応が使用されることを特徴とする請求項1及び4ないし19のいずれか一項記載の方法。

21. 検出相のためのマーカーが、酵素、ビオチン、イミノビオチン、蛍光成分、放射性活性成分、化学発光成分、電子密度成分、磁性成分、抗原、ハプテン及び抗体より成る群から選択されることを特徴とする請求項2または3記載の方法。

22. ELISA法が使用されることを特徴とする請求項2または3及び4ないし19または21のいずれか一項記載の方法。

23. マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第一の錯体化基より成り、これらの基は標的生物学的物質を認識することが可能な第一の生物学的種

にそれ自体結合する第一の遷移金属に対する配位によって結合していることを特徴とする、標的生物学的物質を捕獲するための相。

24. マイクロ微粒子または直鎖状態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基より成り、これらの基は標的生物学的物質を認識することが可能な第二の生物学的種にそれ自体結合する第二の遷移金属、及びマーカに対する配位によって結合していることを特徴とする、標的生物学的物質を検出するための相。

25. 請求項23に記載の捕獲相、及び／または請求項24に記載の検出相を含む、標的生物学的物質を単離するための試薬。

【発明の詳細な説明】

標的生物学的物質を単離するための方法、捕獲相、検出相、及び試薬

本発明は、捕獲相(capture phase)及び任意に検出相(detection phase)を使用した方法による、サンプル中に含まれる、標的(target)生物学的物質として称される生物学的物質の単離または検出に関し、該方法に従って、上記物質は少なくとも捕獲相にさらされ、次いで形成された捕獲相／標的生物学的物質錯体を、任意に上記検出相を使用して検出する。

以下に本発明を提示する際、特に標的タンパク質生物学的物質の単離について言及するか、言うまでもなく本発明の範囲は、それに制限されるものではない。

それ故、本発明に従って、用語、「生物学的物質」は、特に抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、ペプチド、酵素または基質、及びそれらの断片のようなタンパク質または糖タンパク質物質を意味する；しかし、核酸(DNAまたはRNA)、核酸断片、プローブまたはプライマーのような核酸物質、そしてホルモンもまた意味する。

M.Kempe等(1)記載の文献に従って、ポリヒスチジン配列、主にRNアーゼAを含む標的タンパク質を捕獲するための方法が周知であり、該方法に従って、金属に対するヒスチジンのイミダゾール基の高い親和性が使用される。

この方法は以下の工程を含む：

- ー メタクリレート基を使用して官能化されたシリカ粒子より成る捕獲相を使用すること、
- ー 標的タンパク質及び金属錯化剤、主にN-(4-ビニル)ベンジルイミノ二酢酸(VBIDA)を、金属とヒスチジンのイミダゾール基の間の配位結合、及び金属とVBIDAのカルボキシル基の間の配位結合から生ずる錯体を得るために、金属と接触させること、並びに、
- ー 上記官能化シリカ粒子を、上記形成された錯体と接触させること。

この固定化方法は、標的タンパク質の最適な結合を導くものではない。

米国特許第4,246,350号の文献は、遷移金属に結合した錯体化基を含むマクロポーラスポリマーより成る捕獲相を使用して、酵素を固定化するための

方法を記載する。上記捕獲相の欠点は、該ポリマーのマクロポーラスの性質から直接に起因する。この理由は、このマクロポーラスの性質により、捕獲相への酵素の吸着を最適化することができるとしても、該ポリマーの孔に吸着された酵素の群は、上記検出相に対して接近し難いと思われるので、検出相を使用した酵素の単離の検出時間の点で不利となるためである。

本発明に従って、捕獲相への標的生物学的物質の結合を最適化することを可能にするような捕獲相を使用した、標的生物学的物質を単離するための方法が提供され、該方法は同時に、上記捕獲相への上記物質の吸着のいずれかの副反応を減少、または一様に除去するものである。捕獲相の間の相互作用は特異的であり、それ故単離する間を通して、捕獲相に対して効率的に結合する生物学的物質の群を検出することが可能である。

この目的のため、標的生物学的物質を単離するための方法は、以下の性質を有する捕獲相を使用する：

それはマイクロ微粒子形態または直鎖状形態であり、

それは外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び共有結合した第一の錯体化基より成り、

第一の錯体化基は、第一の遷移金属に対する配位によって結合しており、

第一の遷移金属は、それ自体、標的生物学的物質を特異的に認識することが可能である第一の生物学的種に対するキレート化によって結合している。

本発明の方法の一つの変異型に従って、上記定義された捕獲相は、検出相を得るために、マーカを含む。

本発明のもう一つの変異型に従って、以下の性質を有する検出相も使用される

それはマイクロ微粒子または直鎖状形態であり、

それは外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基より成り、

第二の錯体化基は、第二の遷移金属に対する配位によって結合しており、

第二の遷移金属は、それ自体、標的生物学的物質を特異的に認識することが可能である第二の生物学的種、及びマーカに対するキレート化によって結合して

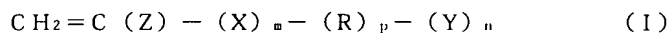
おり、

それはマーカを含む。

本発明に従って、用語、「マイクロ微粒子」は、粒径において10 μ m以下である粒子の形態を意味する。好ましくはそれらは、粒径において5 μ mを越えることはない。

第一及び／または第二の微粒子または直鎖状ポリマーは、有利には、親水性ポリマーであり、特に水溶性モノマー、アクリルアミド、アクリルアミド誘導体、メタクリルアミドまたはメタクリルアミド誘導体、少なくとも一つの架橋剤、及び少なくとも一つの官能性モノマーの重合によって得られる官能化ポリマーである。

この有利なポリマーを得るために、水溶性モノマーは好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-n-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、及びN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから選択され、該モノマーは好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)である。官能性モノマーは好ましくは、以下の式(I)に相当する群に属する：



式中、Zは、H、C1-C5アルキル基、またはベンジル、-COOHまたは-CO-NH-CH(CH₃)₂基を表し、

Yは、-CH₂-COOH、-N(CH₂-COOH)₂、
 $-\text{N}(\text{CH}-\text{COOH})(\text{CH}_2-\text{COOH})$ または $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)_2$ 、
 $\begin{array}{c} | \\ (\text{CH}_2-\text{COOH}) \end{array}$ を表し、

Xは、-NH(CH₂-CH₂-)、-N(CH₂-CH₂-)₂、-N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-)、またはCH(COOH)-を表し、

Rは、任意にOまたはNのような少なくとも一つのヘテロ原子が間に入った直

鎖状炭化水素ベース鎖を表し、

mおよびpはそれぞれ、互いに独立な0または1に等しい整数であり、そして

nは、1から3の間の範囲の整数である。

例として、官能性モノマーは、任意に窒素を含むカルボン酸、イタコン酸、アクリル酸誘導体及びメタクリル酸誘導体から選択される。

上記記載のように、本発明の捕獲相は、マイクロ微粒子形態または直鎖状形態で存在することができる。

それが微粒子形態である場合、それは上記微粒子ポリマーのみから成ることができ、または代わりにそれは微粒子及び／または直鎖状形態の上記第一のポリマーを使用して被覆された、有機または無機の、親水性または疎水性コアのような、微粒子の支持体を含むことができる。

上記コアは有利には、ポリスチレン、シリカ及び金属酸化物を含む群から選択される。それはまた、磁性化合物を含むこともできる。

捕獲相はまた、微粒子及び／または直鎖状形態の第一のポリマーを使用して、部分的または完全に被覆された平坦な支持体を含むこともできる。

本明細書の実施例が説明するように、本発明の第一及び第二の好ましい微粒子ポリマーは、イタコン酸またはマレイン酸-共-メチルビニルエーテルから由来する錯体化基を含むポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)である。

第一及び／または第二の遷移金属は有利には、亜鉛、ニッケル、銅、コバルト、鉄、マグネシウム、マンガン、鉛、パラジウム、白金及び金から選択される。

本発明の方法の好ましい実施態様に従って、第一の生物学的種を捕獲相と接触させること、及び／または第二の生物学的種を検出相と接触させることは、それぞれ上記第一及び第二の生物学的種の等電点以上のpHで実施される。

用語、「生物学的種」は、単離された形態の、上記記載のような生物学的物質を意味し、標的生物学的物質に関して、抗原-抗体、酵素-基質、ホルモン-レセプター、DNA-DNA、RNA-RNA等のタイプの複合体を上記物質と共に形成する親和性を有する。

有利には、第一の生物学的種はタンパク質である。例として、それは、患者の血清から、一つまたは他のタンパク質に対して向けられた抗体を単離することを目的とした、HIVのp24またはgp160タンパク質である。

第一及び／または第二の生物学的種は、遷移金属と反応することが可能な部分を含み、この部分は好ましくはヒスチジンに富む及び／またはシステインに富む領域より成る。

遷移金属イオンに対する生物学的種の親和性の部位は有利には、ヒスチジン、システイン、チロシン、トリプトファン、及びフェニルアラニンから選択されるアミノ酸に富む部位より成る。

該部位は、上記同一のまたは異なる、連続的なまたは非連続的な、しかし近傍のアミノ酸の配列の形態で存在することができる。

これらの部位は、特にそれがタンパク質である場合、生物学的種において天然で存在することができる。代わりに、それらは、樹脂上にIMAC (Immobilized Metal Ion-Affinity Chromatography: 固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー)法によるタンパク質の精製に対して使用される方法のような、当業者に周知の方法に従って、以下に定義されるような「標識」("tag")の形態で、生物学的種内に前もって「付加する」("reported")ことができる(2, 3)。例として、上記部位は、組換えタンパク質を得るために、遺伝学的操作によって、タンパク質性生物学的種、特にタンパク質内に取り込ませることができる。

「標識」とは、アミノ酸の付加された配列、すなわち本来の配列の好ましい部位に導入された、本来の生物学的種に付加された配列として定義することができる、その場合それは、遷移金属とのキレート化のため適切な方法にさらす。本配列は、上記記載されたものから選択されるアミノ酸を含み、それは該配列中で連続的に(特に二つの上記記載の連続的なアミノ酸、好ましくは6個の上記記載の連続的なアミノ酸)、または十分な密度を有して(特に25%、好ましくは33%以上)配置される。一連の6個のヒスチジン及び／またはシステイン残基より成る「標識」が好ましいであろう。

本発明の方法にしたがって、標的生物学物質は、上記記載の捕獲相を使用した凝集反応によって単離することができる。

検出相に対するマーカーは有利には、酵素、ビオチン、イミノビオチン、蛍光成分、放射性活性成分、化学発光成分、電子密度成分、磁性成分、抗原、ハプテン及び抗体より成る群から選択される。

本発明の方法にしたがって、標的生物学的物質は、上記記載の捕獲相及び検出相を使用したELISA法によって単離することができる。

本発明はまた以下のものに関する：

- マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第一の錯体化基より成る、標的生物学的物質を捕獲するための相であり、第一の錯体化基は、標的生物学的物質を認識することかできる第一の生物学的種にそれ自体結合した第一の遷移金属に対する配位によって結合している、
- マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基より成る、標的生物学的物質を検出するための相であり、第二の錯体化基は、標的生物学的物質を認識することができる第二の生物学的種にそれ自体結合した第二の遷移金属、及びマーカーに対する配位によって結合している、
- 上記記載の捕獲相、及び任意に上記記載の検出相を含む、標的生物学的物質を単離するための試薬、
- 上記記載の性質を有する捕獲相及び検出相のそれぞれ。

本発明の特徴及び利点は、実施例1から5、及び図1から3によって以下に説明される：

図1は、MAVEポリマーの、微粒子ポリマー、ポリ（St-NIPAM-AEM）粒子との結合についての等温線を表す。

図2は、媒体のpH及び塩濃度の機能としての、微粒子ポリマー、ポリ（St-NIPAM-MAVE）上に吸着したRH24タンパク質の量における変化を表す。

図3は、媒体のpH及び塩濃度、及び0.3Mのオーダーの Zn^{2+} イオン濃度に対する機能としての、微粒子ポリマー、ポリ（St-NIPAM-MAVE）と錯体化したRH24タンパク質の量を表す。

実施例1：本発明の捕獲相の調製のために使用される試薬

モノマー：

- － 99%スチレン (Janssen Chemica, ref.13279-87)、 $M_w = 104.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは真空下での蒸留による精製の後に使用される。

- － N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) (Kodak ref.10982)、 $M_w = 113.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは以下のように、使用前に再結晶化される。それは、ヘキサン／トルエン混合物 (60/40, v/v) 中に溶解される。

官能性モノマー：

- － 塩化2-アミノエチルメタクリル酸 (AEM) (Kodak ref.18513)、 $M_w = 165.62 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは再結晶化されることなく使用される。

架橋剤：

- － N,N-メチレンビスアクリルアミド (MBA) (Amilabo ref.10897)、 $M_w = 271.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは再結晶化されることなく使用される。

プライマー：

- － 塩酸2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン) (V50) (Wako登録商標)、 $M_w = 271.19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

V50は、以下のように、使用前に再結晶化される。該プライマーを、水及びアセトンの60/40混合物内に溶解する。該溶液を、30%の収率を有する真空下で濾過する。

- － 過硫酸カリウム (Pro labo)、 $M_w = 270.32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは再結晶化することなく使用される。

錯体化基：

- － イタコン酸 (Aldrich)、 $M_w = 132 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

それは再結晶化することなく使用される。

ー 無水マレイン酸-共-メチルビニルエーテル (MAVE) (Polysciences)

それは再結晶化することなく使用される。

実施例2：官能化ポリマー、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)-イタコン酸の合成

4. 38 gのN-イソプロピルアクリルアミド、200 gの水、0. 37 gのMBA、0. 5 gのイタコン酸、及び0. 45 gのアクリルアミドを、250 mlのサーモスタットで制御された反応器内に配する。該混合物に対して、窒素環境の下で70℃の温度で、一分当たり300回転での攪拌を維持する。水溶性ポリマーである過硫酸カリウム(0. 05 g)を、重合反応を開始するために最終時点で該溶液内に添加する(5 gの水に溶解する)。

重合反応を、同じ条件の下で5時間継続する。

重合の転換の程度は、98%と見積もられる。

得られた官能化ポリマーは、以下の性質を有する：

- ー 動的光散乱によって測定した粒径が1500 nmである、
- ー 表面機能のアッセイ、引き続き電気伝導度のアッセイにより、弱酸基(−COOH)の0. 3 mmol/gのラテックスが得られた。

実施例3：錯体化直鎖状ポリマー、ポリMAVEを接合することによるアミノ親水性粒子の修飾

1) 微粒子ポリマー、ポリ(スチレン-NIPAM)の合成

a) 親水性微粒子ポリマーの調製

本実施例に従って、調製は以下のものより成る：

第一の段階として、200 gの水、18 gのスチレン、2 gのNIPAM及び0. 2 gのV50を使用して、密閉反応器における重合に従って、ベースモノマー、すなわちスチレン及びNIPAMを含むポリマー、ポリ(St-NIPAM)を組み合わせる、引き続き、

第二の段階として、所定の程度の変換のために、官能性モノマー(AEM)を、単独またはベース試薬、すなわち5 gのNIPAM、0から4%のAEM(N

PAMに対して)、0.122 gのV50及び0.069 gのBAの存在の下で加える。

本方法は、機能性モノマーの表面での混入を最適化することを可能にする。合成条件は、密閉反応器における重合に対するものと同様である、すなわち、一定温度及び攪拌である。

b) 得られた微粒子ポリマーの性質

得られたポリマーの構造に関する結果として、その粒径及びその多分散性は、以下の表1に表される。

表 1

| ポリマー名 | AEM % | (nm) 20°C (a) | (nm) 50°C (a) | Hair (nm) (b) | (nm) MET (c) | Ip (c) |
|-------|----------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------|
| DD10 | 0 | 603 | 364 | 119 | 288 | 1.012 |
| DD15 | 1 | 421 | 327 | 47 | 333 | 1.008 |
| DD12 | 2 | 484 | 334 | 75 | 302 | 1.004 |
| DD11 | 3 | 358 | 315 | 21 | 303 | 1.005 |

(a) 20°C及び50°Cで動的光散乱によって測定された直径

(b) Hairは粒子の表面でのPNIPAMの厚さに相当する

(c) 電子顕微鏡によって得られた直径及び多分散性指標

ポリマーの表面で存在するアミン官能基のアッセイの結果として表される、得られたポリマーの官能化の程度は、以下の表2に表される。

表 2

| ポリマー名 | AEM (%) 添加 | SPDP* mmol.m ⁻² |
|-------|---------------|-------------------------------|
| DD10 | 0 | 0.75 |
| DD15 | 1 | 1.44 |
| DD12 | 3 | 2.99 |
| DD11 | 4 | 2.76 |

*：動的光散乱によって測定された20°Cでのサイズを使用して計算された荷電密度

2) アミノ化粒子に対するポリMAVEの接合

錯体化基を、1)に従って得られたポリマーに共有結合し、これらの錯体化基は、本実施例に従って、直鎖状ポリマーであるMAVE（無水マレイン酸-共-メチルビニルエーテル：Maleic Anhydride-co-Methyl Vinyl Ether）から由来する基より成る。

MAVEの使用は二つの利点を有する：一つは、その高い反応性の無水物官能基のため、それが微粒子ポリマーの表面に存在するアミンと容易にカップリングすることを許容すること、及びもう一つは、一度カップリングが形成されると、それは遷移金属（Zn、Ni、Cu、Co等）と相互作用するいくつかの錯体化ジカルボン酸基を露出することである。

MAVEは、微粒子ポリマーのアミン官能基とのカップリング反応を可能にする、無水物官能基の加水分解を避けるために、無水DMSOにおける溶液として使用される。カップリング反応は、該ポリマーのアミン官能基のプロトン化を避けるために、塩基性媒体において実施されるべきである。使用されるバッファーは、pH 8.2で 10^{-2} Mのイオン強度を有するホウ酸緩衝液である。カップリング媒体は、10容量%のDMSOを越えない。

図1に表された結果は、二つの分析方法の間の明白な相関関係を示す。カップリング等温線の最初の傾斜は、該反応が追加されたMAVEの少量に対して飽和することを示す。定常期の値は $2.75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ であり、MAVEの低濃度に対して非常に迅速に到達される。

実施例4：錯体化基を含むポリマーを使用した遷移金属の錯体化

実施例2または3に従って得られた、錯体化基を含むポリマーの溶液内への遷移金属の添加は、粒子の錯体化によって該金属を結合させるはずである。この錯体化は、無水物官能基の酸素原子によって生ずる。酸素原子の孤立電子対の存在

により、遷移金属との配位結合を形成することが可能である。

使用される金属（ Zn^{2+} ）は、 10^{-4} Mの金属イオン溶液の濃度を得るために、該ポリマー溶液内に添加される。溶液内に存在する過剰な金属カチオンは、連続的な遠心分離によって除去される。

実施例5：本発明の捕獲相を得るための、生物学的種として使用されるRH24

タンパク質の錯体化

本実施例のために選択された生物学的種は、ヒスチジン「標識」（6個の連続的なヒスチジン残基の配列）を使用してN末端で修飾された組換えタンパク質（RH24と称される）である(5)。このタンパク質は、 $27 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ の質量を有し、6.1の等電点を有する。この修飾は、本発明の捕獲相を得るために、微粒子支持体上への該タンパク質の錯体化を成し遂げるために利用された。

ラテックス上に錯体化したタンパク質の濃度を測定することを可能にするために、該タンパク質の吸着の研究を並行して実施した。

従来技術が示すように、親水性ポリマー上への該タンパク質の吸着を決定する静電相互作用が存在する(6)。それ故、吸着されるタンパク質の量に対するイオン強度及びpHの影響を、該吸着がほとんど生じない、または全く存在しない条件を決定するために研究した。

図2は、実施例3に従って得られたポリ（St-NIPAM-MAVE）上へのRH24タンパク質の吸着を示す。

図2に従って、RH24の吸着の程度は、非常にpH依存的事であることが示される。

同様な研究を、同じパラメータを変化することによって錯体化について実施した。図3は、様々なイオン強度、及び錯体化イオン（ Zn^{2+} ）の一定濃度に対する、pHに依存した錯体化の結果を示す。

この図に示されるように、亜鉛の存在の下でのポリ（St-NIPAM-MAVE）との該タンパク質の錯体化は、低いイオン強度の場合を除いて、pHにほとんど依存しない。

この結果により、吸着することのない錯体化のための最適な条件を決定するこ

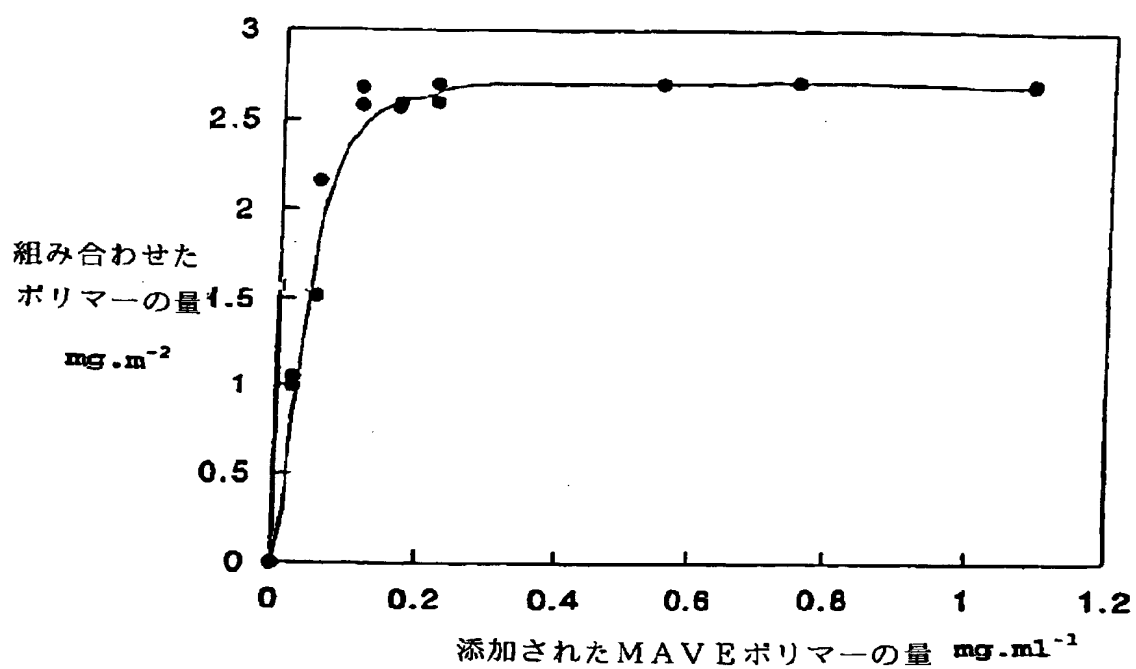
とが可能である。それ故、7以上のpHが、実質的に全く吸着を有しないことを可能にする一方で、同時に $1.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ に近い錯体化を有する。イオン強度に関して、これは錯体化を促進するために最小でなければならない。

参考文献

- (1) Kempe M., Glad M. & Mosbach K., *Journal of molecular recognition*, 8, 35 (1995)
- (2) Porath J., Carlsson., Olsson., Belfrage J., *Nature*, 258, 598 (1975)
- (3) Porath J., *Trends Anal. Chem.*, 7, 254 (1988)
- (4) Hiroshi Inomata et al., *Macromolecules*, 27, 6459-6464 (1994)
- (5) Cheynet V., Verrier B., Mallet F., *proteine expression and purification*, 4, 367 (1993)
- (6) Suzawa T., Shirahama H., *Advances in Colloid and Interface Science*, 35, 139 (1991).

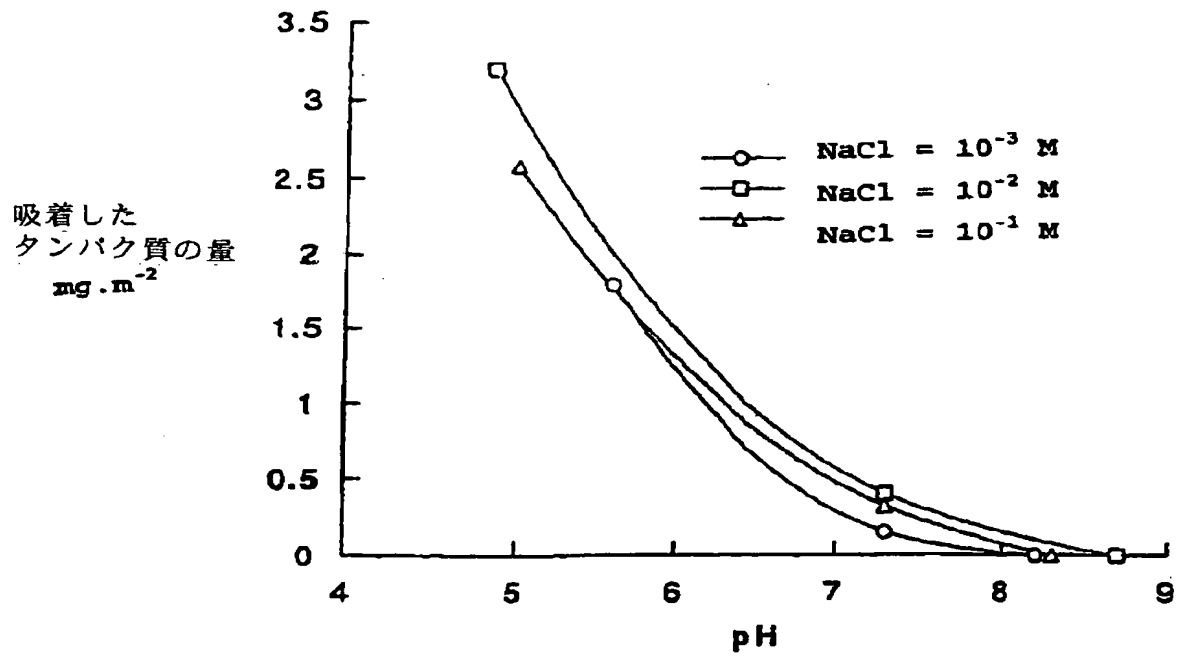
【図1】

FIG1



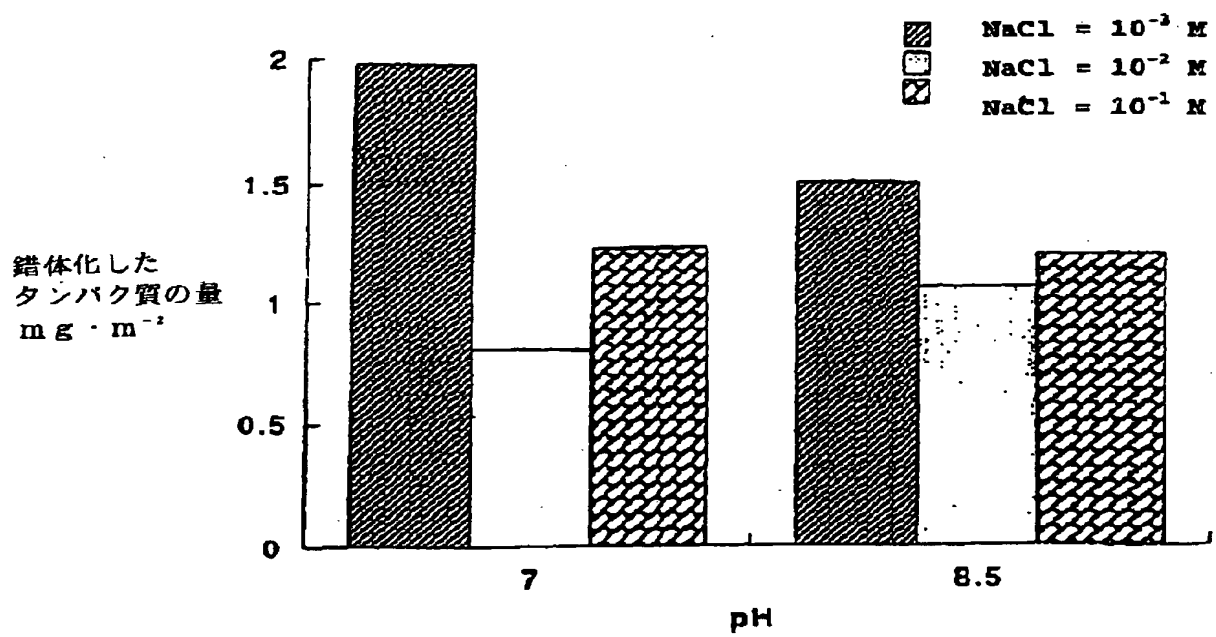
【図2】

FIG 2



【図3】

FIG 3



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年6月14日（1999. 6. 14）

【補正内容】

明細書

標的生物学的物質を単離するための方法、捕獲相、検出相、及び試薬

本発明は、捕獲相(capture phase)及び任意に検出相(detection phase)を使用した方法による、サンプル中に含まれる、標的(target)生物学的物質として称される生物学的物質の単離または検出に関し、該方法に従って、上記物質は少なくとも捕獲相にさらされ、次いで形成された捕獲相／標的生物学的物質錯体を、任意に上記検出相を使用して検出する。

以下に本発明を提示する際、特に標的タンパク質生物学的物質の単離について言及するが、言うまでもなく本発明の範囲は、それに制限されるものではない。

それ故、本発明に従って、用語、「生物学的物質」は、特に抗原、ハプテン、抗体、タンパク質、ペプチド、酵素または基質、及びそれらの断片のようなタンパク質または糖タンパク質物質を意味する；しかし、核酸(DNAまたはRNA)、核酸断片、プローブまたはプライマーのような核酸物質、そしてホルモンもまた意味する。

欧州特許出願E P-A-0, 516, 198に従って、磁性粒子よりなる捕獲相を使用する生物学的物質を検出するための方法が記載されている。この捕獲相は、遷移金属と、上記金属の原子が結合するのに利用可能な配位部位を有するポリマーの共沈降によって得られ、引き続き二官能性試薬を介して上記ポリマーの反応部位に対する生物学的種の結合を生じ、上記種は検出される物質に対する親和性を有する。

M.Kempe等(1)記載の文献に従って、ポリヒスチジン配列、主にRNアーゼAを含む標的タンパク質を捕獲するための方法が周知であり、該方法に従って、金属に対するヒスチジンのイミダゾール基の高い親和性が使用される。

この方法は以下の工程を含む：

ー メタクリラート基を使用して官能化されたシリカ粒子より成る捕獲相を使用すること、

- ー 標的タンパク質及び金属錯化剤、主にN-(4-ビニル)ベンジルイミノニ酢酸 (V B I D A) を、金属とヒスチジンのイミダゾール基の間の配位結合、及び金属とV B I D Aのカルボキシル基の間の配位結合から生ずる錯体を得るために、金属と接触させること、並びに、
- ー 上記官能化シリカ粒子を、上記形成された錯体と接触させること。

この固定化方法は、標的タンパク質の最適な結合を導くものではない。

米国特許第4, 246, 350号の文献は、遷移金属に結合した錯体化基を含むマクロポーラスポリマーより成る捕獲相を使用して、酵素を固定化するための方法を記載する。上記捕獲相の欠点は、該ポリマーのマクロポーラスの性質から直接に起因する。この理由は、このマクロポーラスの性質により、捕獲相への酵素の吸着を最適化することかできるとしても、該ポリマーの孔に吸着された酵素の群は、上記検出相に対して接近し難いと思われるので、検出相を使用した酵素の単離の検出時間の点で不利となるためである。

本発明に従って、捕獲相への標的生物学的物質の結合を最適化することを可能にするような捕獲相を使用した、標的生物学的物質を単離するための方法が提供され、該方法は同時に、上記捕獲相への上記物質の吸着のいずれかの副反応を減少、または一様に除去するものである。捕獲相と生物学的物質の間の相互作用は特異的であり、それ故単離する間を通して、捕獲相に対して効率的に結合する生物学的物質の群を検出することが可能である。

この目的のため、標的生物学的物質を単離するための方法は、以下の性質を有する捕獲相を使用する：

それはマイクロ微粒子形態または直鎖状形態であり、それは外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び共有結合した第一の錯体化基より成り、

第一の錯体化基は、第一の遷移金属に対する配位によって結合しており、

第一の遷移金属は、それ自体、標的生物学的物質を特異的に認識することが可能である第一の生物学的種に対するキレート化によって結合している。

本発明の方法の一つの変異型に従って、上記定義された捕獲相は、検出相を得るために、マーカを含む。

本発明のもう一つの変異型に従って、以下の性質を有する検出相も使用される
それはマイクロ微粒子または直鎖状形態であり、

それは外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖
状ポリマー、及び第二の錯体化基より成り、

第二の錯体化基は、第二の遷移金属に対する配位によって結合しており、

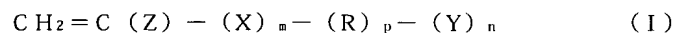
第二の遷移金属は、それ自体、標的生物学的物質を特異的に認識することが可
能である第二の生物学的種に対するキレート化によって結合しており、

それはマーカーを含む。

本発明に従って、用語、「マイクロ微粒子」は、粒径において $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下で
ある粒子の形態を意味する。好ましくはそれらは、粒径において $5\text{ }\mu\text{m}$ を越える
ことはない。

第一及び／または第二の微粒子または直鎖状ポリマーは、有利には、親水性ポ
リマーであり、特に水溶性モノマー、アクリルアミド、アクリルアミド誘導体、
メタクリルアミドまたはメタクリルアミド誘導体、少なくとも一つの架橋剤、及
び少なくとも一つの官能性モノマーの重合によって得られる官能化ポリマーであ
る。

この有利なポリマーを得るために、水溶性モノマーは好ましくは、N-イソプロ
ピルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド
、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-n-イソプロピルメタクリルアミド、N-シク
ロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプ
ロピルアクリルアミド、及びN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから
選択され、該モノマーは好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM)
である。官能性モノマーは好ましくは、以下の式 (I) に相当する群に属す
る：



式中、Zは、H、C1-C5アルキル基、またはベンジル、-COOHまたは
-CO-NH-CH(CH₃)₂基を表し、

Yは、-CH₂-COOH、-N(CH₂-COOH)₂、

$$-N(CH-COOH)(CH_2-COOH) \text{ または } -(CH_2-CH_2-NH_2)_2,$$

$$\quad |$$

$$(CH_2-COOH) \text{ を表し、}$$

X は、 $-NH(CH_2-CH_2-)$ 、 $-N(CH_2-CH_2-)_2$ 、 $-N(CH_2-COOH)(CH_2-CH_2-)$ 、または $CH(COOH)-$ を表し、

請求の範囲

1. 捕獲相を使用し、標的生物学的物質を少なくとも捕獲相と接触させ、捕獲相／標的生物学的種錯体を検出することを特徴とする、サンプル中に含まれる標的生物学的物質を単離するための方法であって、捕獲相はマイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第一の錯体化基より成り、これらの基は、上記第一のポリマーに対して共有結合し、および標的生物学的物質を特異的に認識することか可能な第一の生物学的種にキレート化によってそれ自体結合する第一の遷移金属により配位によって結合していることを特徴とする方法。
2. 捕獲相が、上記生物学的物質を検出するための相を得るためにマーカを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。
3. マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、外見上親水性の性質を有する少なくとも一つの第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基より成る検出相も使用し、これらの基は標的生物学的物質を特異的に認識することが可能な第二の生物学的種にそれ自体結合する第二の遷移金属、及びマーカに対する配位によって結合していることを特徴とする請求項1記載の方法。
4. 第一のポリマーが、親水性ポリマーの群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。
5. 第二のポリマーが、親水性ポリマーの群から選択されることを特徴とする請求項3、または請求項4及び3の組み合わせに記載の方法。
6. 第一のポリマーが、水溶性モノマー、アクリルアミド、アクリルアミド誘導体、メタクリルアミドまたはメタクリルアミド誘導体、少なくとも一つの架橋剤

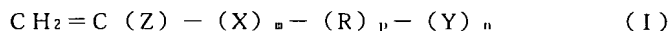
、及び少なくとも一つの官能性モノマーの重合によって得られる官能化ポリマーで

あることを特徴とする請求項4記載の方法。

7. 第二のポリマーが、水溶性モノマー、アクリルアミド、アクリルアミド誘導体、メタクリルアミドまたはメタクリルアミド誘導体、少なくとも一つの架橋剤、及び少なくとも一つの官能性モノマーの重合によって得られる官能化ポリマーであることを特徴とする請求項5、及び任意に請求項6記載の方法。

8. 水溶性モノマーが、N-イソプロピルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-n-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、及びN-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから選択され、第一のモノマーは好ましくは、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)であることを特徴とする請求項6及び/または7記載の方法。

9. 官能性モノマーが、以下の式(I)：



[式中、Zは、H、C1-C5アルキル基、またはベンジル、-COOHまたは-CO-NH-CH(CH₃)₂基を表し、

Yは、-CH₂-COOH、-N(CH₂-COOH)₂、
-N(CH-COOH)(CH₂-COOH) または -(CH₂-CH₂-NH₂)₂、
|
(CH₂-COOH) を表し、

Xは、-NH(CH₂-CH₂-)、-N(CH₂-CH₂-)₂、-N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-)、またはCH(COOH)-を表し、

Rは、任意にOまたはNのような少なくとも一つのヘテロ原子が間に入った直鎖状炭化水素ベース鎖を表し、

mおよびpはそれぞれ、互いに独立な0または1に等しい整数であり、そして

nは、1から3の間の範囲の整数である]

に相当することを特徴とする請求項6及び／または7記載の方法。

10. 官能性モノマーが、任意に窒素を含有するカルボン酸誘導体、イタコン酸、アクリル酸誘導体、及びメタクリル酸誘導体から選択されることを特徴とする請求項9記載の方法。

11. 捕獲相がマイクロ微粒子形態で存在し、平均粒径が5 μ m以下であることを特徴とする請求項1ないし10のいずれか一項記載の方法。

12. 検出相がマイクロ微粒子形態で存在し、平均粒径が5 μ m以下であることを特徴とする請求項3及び5ないし11のいずれか一項記載の方法。

13. 捕獲相が平坦なまたは微粒子支持体も含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

14. 支持体が微粒子であり、有機または無機の、親水性または疎水性のコアより成ることを特徴とする請求項13記載の方法。

15. 上記コアが、ポリスチレン、シリカ及び金属酸化物を含む群から選択されることを特徴とする請求項14記載の方法。

16. 上記コアが磁性化合物も含むことを特徴とする請求項14または15記載の方法。

17. 上記コアが上記第一のポリマーを使用して被覆されており、このポリマーが直鎖状であることを特徴とする請求項14ないし16のいずれか一項記載の方法。

18. 上記コアが上記ポリマーを使用して被覆されており、上記ポリマーが微粒

子であることを特徴とする請求項14ないし16のいずれか一項記載の方法。

19. 第一のポリマーが、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)であり、錯体化基がイタコン酸または無水マレイン酸-共-メチルビニルエーテルから由来することを特徴とする請求項1記載の方法。

20. 第二のポリマーが、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)であり、錯体化基がイタコン酸または無水マレイン酸-共-メチルビニルエーテルから由来す

ることを特徴とする請求項3、または請求項3及び19の組み合わせに記載の方法。

21. 第一の遷移金属が、亜鉛、ニッケル、銅、コバルト、鉄、マグネシウム、マンガン、鉛、パラジウム、白金及び金から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

22. 第二の遷移金属が、亜鉛、ニッケル、銅、コバルト、鉄、マグネシウム、マンガン、鉛、パラジウム、白金及び金から選択されることを特徴とする請求項3、または請求項3及び21の組み合わせに記載の方法。

23. 第一の生物学的種を捕獲相と接触させることが、上記第一の生物学的種の等電点以上のpHで実施されることを特徴とする請求項1記載の方法。

24. 第二の生物学的種を検出相と接触させることが、上記第二の生物学的種の等電点以上のpHで実施されることを特徴とする請求項3、または請求項3及び23の組み合わせに記載の方法。

25. 第一の生物学的種が、ヒスチジン及び／またはシステインに富むことを特徴とする請求項1記載の方法。

26. 第二の生物学的種が、ヒスチジン及び／またはシステインに富むことを特徴とする請求項3、または請求項3及び25の組み合わせに記載の方法。

27. 凝集反応が使用されることを特徴とする請求項1記載の方法。

28. 検出相のためのマーカーが、酵素、ビオチン、イミノビオチン、蛍光成分、放射性活性成分、化学発光成分、電子密度成分、磁性成分、抗原、ハプテン及び抗体より成る群から選択されることを特徴とする請求項2または3記載の方法。

29. ELISA法が使用されることを特徴とする請求項2または3記載の方法。

30. マイクロ微粒子または直鎖状形態で存在し、標的生物学的物質を捕獲するための相としての、外見上親水性の性質を有する第一の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第一の錯体化基の使用であり、第一の錯体化基は、標的生物学的物質を認識することが可能な第一の生物学的種にそれ自体結合する第一の遷移金属に

対する配位によって結合していることを特徴とする使用。

31. マイクロ微粒子または直鎖状態で存在し、標的生物学的物質を検出するための相としての、外見上親水性の性質を有する第二の微粒子または直鎖状ポリマー、及び第二の錯体化基の使用であり、第二の錯体化基は、標的生物学的物質を認識することが可能な第二の生物学的種にそれ自体結合する第二の遷移金属、及びマーカに対する配位によって結合していることを特徴とする使用。

32. 標的生物学的物質を単離するための試薬における、請求項30に記載の第一のポリマーの使用、及び／または請求項31に記載の第二のポリマーの使用。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/00772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/545 C08F220/54 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|------------|--|----------------------|
| Y | EP 0 516 198 A (IMMUNICON CORPORATION) 2 December 1992 see the whole document --- | 1-25 |
| Y | US 4 246 350 A (HIER DEBORAH E ET AL) 20 January 1981 see examples 1,2 --- | 1-25 |
| Y | US 5 244 816 A (SUBRAMANIAN RAMASWAMY) 14 September 1993 see column 4 --- | 1-25 |
| Y | EP 0 310 872 A (HYGEIA SCIENCES, INC.) 12 April 1989 see the whole document --- | 1-25 |

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 1998

Date of mailing of the international search report

14/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Palatinan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Application No.
 PCT/FR 98/00772

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No. |
| Y | EP 0 156 537 A (THE BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2 October 1985 see abstract; claims --- | 1-25 |
| A | EP 0 659 779 A (FUJIMORI KOGYO CO) 28 June 1995 see table 2 --- | 1-25 |
| A | US 3 880 814 A (MIZUTANI KIYOSHI) 29 April 1975 see abstract --- | 1-25 |
| A | KEMPE M ET AL: "An Approach to Surface Imprinting Using The Enzyme Ribonuclease A" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 8, 1995, page 35 XP002050518 cited in the application see page 36; figure 1 --- | 1-25 |
| A | FR 2 268 818 A (CESKOSLOVENSKA AKADEMIE VED) 21 November 1975 see page 3 - page 4; examples 9.12,15 --- | 1-25 |
| A | US 5 132 243 A (OHDAIRA AKIO ET AL) 21 July 1992 see abstract --- | 1-25 |
| A | US 4 784 912 A (SCHAEFFER JAMES R ET AL) 15 November 1988 see abstract ----- | 1-25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00772

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 516198 A | 02-12-1992 | US 4795698 A | 03-01-1989 |
| | | AT 156366 T | 15-08-1997 |
| | | CA 1275533 A | 23-10-1990 |
| | | DE 3650644 D | 11-09-1997 |
| | | DE 3650644 T | 12-03-1998 |
| | | DE 3689618 D | 17-03-1994 |
| | | DE 3689618 T | 11-05-1994 |
| | | EP 0244444 A | 11-11-1987 |
| | | JP 2588181 B | 05-03-1997 |
| | | JP 63501978 T | 04-08-1988 |
| | | WO 8702063 A | 09-04-1987 |
| | | US 5512332 A | 30-04-1996 |
| | | US 5597531 A | 28-01-1997 |
| | | | |
| US 4246350 A | 20-01-1981 | NONE | |
| US 5244816 A | 14-09-1993 | AT 145560 T | 15-12-1996 |
| | | AU 656717 B | 16-02-1995 |
| | | AU 6547190 A | 16-05-1991 |
| | | CA 2069303 A | 12-04-1991 |
| | | DE 69029274 D | 09-01-1997 |
| | | DE 69029274 T | 28-05-1997 |
| | | DK 48892 A | 10-04-1992 |
| | | EP 0495878 A | 29-07-1992 |
| | | ES 2097156 T | 01-04-1997 |
| | | FI 921579 A | 09-04-1992 |
| | | GR 3022645 T | 31-05-1997 |
| | | IE 75714 B | 24-09-1997 |
| | | JP 5503354 T | 03-06-1993 |
| | | PT 95574 A,B | 14-08-1991 |
| | | WO 9106008 A | 02-05-1991 |
| | | US 5800802 A | 01-09-1998 |
| | | | |
| EP 310872 A | 12-04-1989 | US 4859612 A | 22-08-1989 |
| | | AU 2299788 A | 13-04-1989 |
| | | CA 1334931 A | 28-03-1995 |
| | | CN 1032458 A | 19-04-1989 |
| | | IN 171131 A | 01-08-1992 |
| | | JP 1123149 A | 16-05-1989 |
| | | MX 166767 B | 03-02-1993 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 98/00772

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 310872 A | | RU 2025732 C | 30-12-1994 |
| EP 0156537 A | 02-10-1985 | JP 61087303 A | 02-05-1986 |
| | | US 4920061 A | 24-04-1990 |
| EP 0659779 A | 28-06-1995 | JP 7179504 A | 18-07-1995 |
| | | AU 689159 B | 26-03-1998 |
| | | AU 8152394 A | 29-06-1995 |
| | | CA 2138571 A | 23-06-1995 |
| | | DE 69410763 D | 09-07-1998 |
| | | US 5635574 A | 03-06-1997 |
| US 3880814 A | 29-04-1975 | NONE | |
| FR 2268818 A | 21-11-1975 | CS 173846 B | 31-03-1977 |
| | | CA 1041695 A | 31-10-1978 |
| | | CH 619971 A | 31-10-1980 |
| | | DE 2517511 A | 13-11-1975 |
| | | GB 1467771 A | 23-03-1977 |
| | | JP 50146696 A | 25-11-1975 |
| | | NL 7504823 A | 27-10-1975 |
| | | SE 411352 B | 17-12-1979 |
| | | SE 7504411 A | 24-10-1975 |
| | | US 4062831 A | 13-12-1977 |
| US 5132243 A | 21-07-1992 | JP 2012491 C | 02-02-1996 |
| | | JP 7043383 B | 15-05-1995 |
| | | JP 63066464 A | 25-03-1988 |
| | | DE 3784701 A | 15-04-1993 |
| | | EP 0286687 A | 19-10-1988 |
| | | WO 8802119 A | 24-03-1988 |
| US 4784912 A | 15-11-1988 | US 4735907 A | 05-04-1988 |
| | | CA 1254131 A | 16-05-1989 |
| | | DE 3685600 A | 16-07-1992 |
| | | EP 0195623 A | 24-09-1986 |
| | | JP 61218945 A | 29-09-1986 |
| | | JP 62142275 A | 25-06-1987 |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ピシヨ, クリスティアン
フランス国 69960 コルバ アレ ロラ
ン ガロ 5

(72)発明者 マレ, フランソワ
フランス国 69100 ヴィルーバンヌ リ
ュ アナトール フランス 84

(72)発明者 ノヴリールソー, アルメル
フランス国 38180 セイザン リュ デ
ユ パルク 29